

Monoclonal antibodies to osteocalcin - reacting specifically with active form, useful for diagnosis, esp. of bone disease

Patent Number: DE4008546
Publication date: 1990-09-20
Inventor(s): HINO FUMITSUGU (JP); YOKOTA HIROKO (JP); KATO IKUNOSHIN (JP); KOYAMA NOBUTO (JP); OHARA KANAKO (JP)
Applicant(s): TAKARA SHUZO CO (JP)
Requested Patent: DE4008546
Application Number: DE19904008546 19900316
Priority Number(s): JP19890062126 19890316
IPC Classification: C07K15/28 ; C12N5/18 ; C12Q1/28 ; G01N33/577
EC Classification: C07K16/18
Equivalents: JP2242696, JP7039439B

Abstract

New monoclonal antibodies react specifically with osteocalcin (OC) contg. a gamma-carboxyglutamate (Gla) gp. and do not react with OC not contg. a Gla gp.

Also claimed are (a) hybridomas producing antibodies of the above type, (b) hybridoma FERM BP-2724, which produces antibodies that react with both Gla-contg. and Gla-free OC and (c) antibodies produced by FERM BP-2724.

USE/ADVANTAGE - The antibodies are capable of distinguishing between the active (Gla-contg) and inactive (Gla-free) forms of OC and are thus useful for diagnosis of diseases associated with abnormal active OC levels esp. bone diseases such as post-menopausal osteoporosis, as well as myeloma, Behcet's disease, chronic kidney disease and hyperthyroidism.

Data supplied from the **esp@cenet** database - I2

⑯ BUNDESREPUBLIK

DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑯ Offenlegungsschrift
⑯ DE 4008546 A1

⑯ Int. Cl. 5:

C12N 5/18

C 07 K 15/28

C 12 Q 1/28

G 01 N 33/577

// C07K 3/20

⑯ Unionspriorität: ⑯ ⑯ ⑯

16.03.89 JP 62126/89

⑯ Anmelder:

Takara Shuzo Co., Ltd., Kyoto, JP

⑯ Vertreter:

Vossius, V., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Tauchner, P.,
Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Heunemann, D., Dipl.-Phys.
Dr.rer.nat.; Rauh, P., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.;
Hermann, G., Dipl.-Phys. Dr.rer.nat.; Schmidt, J.,
Dipl.-Ing.; Jaenichen, H., Dipl.-Biol. Dr.rer.nat.,
Pat.-Anwälte; Tremmel, H., Rechtsanw., 8000
München

⑯ Erfinder:

Hino, Fumitsugu, Kusatsu, Shiga, JP; Yokota,
Hiroko; Otsu, Shiga, JP; Kato, Ikunoshin; Koyama,
Nobuto, Uji, Kyoto, JP; Ohara, Kanako, Kobe,
Hyogo, JP

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑯ Osteocalcin-spezifischer monoklonaler Antikörper

Die Erfindung betrifft die Bereitstellung und Verwendung
eines monoklonalen Antikörpers mit einer hohen Spezifität
und Selektivität für Osteocalcin das eine γ -Carboxygluta-
matgruppe besitzt.

Der monoklonale Antikörper lässt sich aus gezüchteten Hy-
bridomzellen gewinnen, die aus der Fusion von Milzzellen
von immunisierten Mäusen mit Maus-Myelomzellen erhalten
worden sind.

Der Antikörper ist für den quantitativen Nachweis von
Osteocalcin mit einer γ -Carboxyglutamatgruppe neben
Osteocalcin ohne eine derartige Gruppe geeignet.

DE 4008546 A1

DE 4008546 A1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft einen monoklonalen Antikörper, der gegen Osteocalcin (nachstehend als OC bezeichnet), gerichtet ist, das eine γ -Carboxyglutamatgruppe (nachstehend als Gla bezeichnet) besitzt. Sie betrifft ferner die Anwendung des monoklonalen Antikörpers in einem diagnostischen Besteck.

OC ist ein Calcium bindendes, von Osteocyten synthetisiertes Protein, das, abhängig von Vitamin K, eine Gla-Gruppe besitzt. Im allgemeinen ist der OC-Spiegel im Blut von Patienten mit Knochenerkrankungen, bei denen der Knochenstoffwechsel beschleunigt ist, erhöht. OC ist deshalb ein biochemischer Indikator für den Knochenstoffwechsel. In den letzten Jahren wird es auch als Indikator bei der Diagnose von postklimakterischer Osteoporose, Myelomen, der Behcet'schen Krankheit, chronischem Nierenversagen, Hyperthyroidismus usw. benutzt. Ein zu diesem Zweck entworfener radioimmunologischer Test ist von P.A. Prince et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, (1980), 2234 beschrieben. Mit dem Verfahren, das polyclonale Antikörper verwendet, ist es möglich, die OC-Konzentration im menschlichen Blut zu bestimmen. Ein entsprechender enzymatisch-immunologischer Test unter Verwendung von monoklonalen Antikörpern ist in JP-A-1 60 493/89 offenbart.

Da OC, das eine Affinität für Calcium und Hydroxyapatit besitzt, die Fähigkeit verliert, Calcium zu binden, wenn man durch thermische Decarboxylierung die Gla-Gruppe in eine Glu-Gruppe überführt, muß die Gla-Gruppe notwendig für die Calcium-Bindungsfähigkeit sein (J. W. Poser, J. Biol. Chem. 254, (1979), 431). Es gilt deshalb als wahrscheinlich, daß die Gla-Gruppe von OC für die Regulation des Calciumtransfers vom Knochen zur Körperlüssigkeit wichtig ist.

Weder mit dem herkömmlichen publizierten Verfahren, bei dem die immunologischen Untersuchungen von OC unter Verwendung polyclonaler anti-OC-Antikörper durchgeführt wurden (H. Tanaka et al., J. Immunol. Methods 94, (1986) 19) noch mit dem in der JP-A-1 60 493/89 offenbarten Verfahren ist es möglich, zwischen OC mit einer Gla-Gruppe und OC ohne Gla-Gruppe zu unterscheiden. Es ist daher nicht möglich, die Menge von OC mit einer Gla-Gruppe, die die aktive Form von OC darstellt und den biologischen Effekt im Körper ausübt, zu bestimmen.

Die Aufgabe der Erfindung besteht somit in der Bereitstellung eines Mittels zur spezifischen Bestimmung von Osteocalcin, das eine γ -Carboxyglutamatgruppe enthält. Ferner besteht die Aufgabe der Erfindung in der Bereitstellung eines Hybridomclons, der einen monoklonalen Antikörper produziert, der spezifisch gegen ein γ -Carboxyglutamatgruppe enthaltendes Osteocalcin gerichtet ist.

Diese Aufgabe wird mit den Merkmalen der Patentansprüche gelöst.

Der erfindungsgemäße monoklonale Antikörper ermöglicht die spezifische Bestimmung von OC mit einer Gla-Gruppe. Er stellt daher eine wertvolle Hilfe bei der Aufklärung der Rolle von aktiviertem OC für den Knochenstoffwechsel dar. Ferner ist dieser monoklonale Antikörper für die Bestimmung von aktiviertem OC im Blut von Patienten mit Knochenerkrankungen und für ähnliche Anwendungen sehr nützlich.

Der erfindungsgemäße monoklonale Antikörper wird durch Zellfusion hergestellt. Das heißt, Zell-Hybride werden aus Antikörper-produzierenden Zellen und Knochenmark-Tumorzellen hergestellt und cloniert. Anschließend wird ein Clon selektiert, der einen Antikörper produziert, der für OC mit einer Gla-Gruppe spezifisch ist. Dieser Antikörper wird dann hergestellt. Beispiele von Zellen, die Antikörper produzieren, sind Milzzellen, Lymphknotenzellen, B-Lymphocyten und andere Zellen, die man aus Tieren erhält, die mit OC, das eine Gla-Gruppe besitzt, immunisiert worden sind. Beispiele von Tieren, die zu diesem Zweck immunisiert werden können, sind Mäuse, Ratten, Pferde, Ziegen und Kaninchen. Es ist möglich, OC aus den Knochen von Tieren als Antigen zu verwenden. Zum Beispiel läßt sich OC für die Immunisierung wie folgt herstellen. Pulverisierter Rinderknochen wird mit einer EDTA-Lösung extrahiert und Rinder-OC läßt sich mit HPLC auf einer Octadecyl-Kieselgel (ODS)-Säule reinigen. Das in dieser Weise erhaltene Rinder-OC kann an ein Trägerprotein, wie z. B. Nafpschnecken-Hämocyanin (keyhole limpet hemocyanin = KLH) gebunden werden. Das Proteinkonjugat kann mit Polyvinylpyrrolidon (PVP) und mit Freund's Adjuvants vermischt zur Immunisierung von Tieren benutzt werden. Es ist auch möglich, das Rinder-OC direkt mit Freund's-Adjuvants zu vermischen und das Gemisch zur Immunisierung zu verwenden. Zur Gewinnung eines monoklonalen Antikörpers, der Gla-Gruppen oder Peptide, die Gla-Gruppen enthalten, erkennt, wird die Bindung von OC über seine Aminogruppen an ein Trägerprotein wie KLH bevorzugt. Zu diesem Zweck kann eine Reaktion mit KLH durchgeführt werden, in das durch die Verwendung von 2-Iminothiolan oder ähnlichen, Reagenzien SH-Gruppen eingeführt worden sind; das KLH läßt man mit OC reagieren, das mit Hilfe von Succinimidyl trans-4-(N-Maleimidylmethyl)-cyclohexan-1-carboxylat (SMCC) oder einem ähnlichen Reagenz mit Maleimidgruppen versehen worden ist.

Die Immunisierung der Tiere wird durch Injektion von je 20 bis 200 μ g Antigen subkutan, intramuskulär oder intraperitoneal durchgeführt. Die Injektionen werden alle 2 oder 3 Wochen innerhalb eines Zeitraumes von 3 bis 7 Wochen verabreicht. Ungefähr 3 bis 5 Tage nach der letzten Immunisierung werden die Antikörper produzierenden Zellen den immunisierten Tieren entnommen.

Die Myelomzellen lassen sich aus Mäusen, Ratten, Menschen oder anderen Quellen erhalten. Die Zellfusion kann man nach dem Verfahren von G. Köhler und C. Milstein (Nature, 256 (1975) 495) oder nach einem auf diesem Verfahren basierenden Verfahren durchführen. Für die Zellfusion benutzt man 30- bis 50%iges Polyethylenglykol (Molekulargewicht 1000 bis 4000). Die Reaktion wird 1 bis 5 Minuten bei 30 bis 40°C durchgeführt.

Die durch Zellfusion erhaltenen Hybridome werden abgesucht. Für das Absuchen werden OC mit Gla-Gruppe und OC ohne Gla-Gruppe als Antigene verwendet. Das Absuchen wird nach dem Enzym-Antikörper- oder einem ähnlichen Verfahren durchgeführt. Clones werden mit dem Grenz-Verdünnungs- oder einem ähnlichen Verfahren erhalten. Die erhaltenen Clones werden zunächst nach dem gewünschten monoklonalen Antikörper z. B. unter Verwendung des Enzym-Antikörper-Verfahrens abgesucht. Die erhaltenen Clones werden BALB/c-Mäusen intraperitoneal implantiert, die mit 2,6,10,14-Tetramethylpentadecan (Pristan) oder ähnlichen Mitteln

vorbehandelt worden waren. Nach 10 bis 14 Tagen wird der Ascites, der eine hohe Konzentration des monoklonalen Antikörpers enthält, der Maus entnommen. Der monoklonale Antikörper wird aus dem Ascites durch bekannte Verfahren, die eine leichte Reinigung von Immunglobulinen ermöglichen, gewonnen. Dazu gehören unter anderem Ammoniumsulfatfraktionierung, Polyethylenglykolfraktionierung, Ionenaustauschchromatographie, Gelchromatographie und Affinitätschromatographie.

Der auf diese Weise erhaltene monoklonale Antikörper ist für OC mit einer Gla-Gruppe spezifisch. Wegen seiner hohen Spezifität ist er sehr geeignet zur Messung von OC mit einer Gla-Gruppe, (d.h. der aktiven Form von OC) in Serum-, Blut- oder Urin- und in anderen dem Körper entnommenen Proben. Für diese Messung kann der monoklonale Antikörper selbst genommen werden, oder man kann ein Fragment benutzen, das eine mit diesem Antikörper korrespondierende immunologische Spezifität aufweist, wie z. B. ein Fab'-Fragment etc.

Die Erfindung wird im folgenden, teilweise mit Bezug auf die begleitende Zeichnung, erläutert. Fig. 1 zeigt die Sensitivität und die Spezifität von OC-Bestimmungen durch das "Sandwich-EIA" (enzyme immun assay)-Verfahren unter Verwendung des erfundungsgemäßen monoklonalen Antikörpers.

Beispiel 1

5

10

15

Herstellung des monoklonalen Antikörpers

(1) Reinigung des Antigens

20

Aus pulverisierten Oberschenkelknochen vom Rind wurden die Knochenproteine mit 0,5 M EDTA, pH 8, extrahiert. Eine Suspension des Extraktes wurde zentrifugiert. Der Überstand wurde lyophilisiert und das im Überstand enthaltene Rinder-OC wurde durch HPLC auf einer ODS-Säule erhalten.

(2) Immunisierung der Maus

25

30

35

5 mg Rinder-OC wurden in 0,5 ml 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,0, gelöst. Diese Lösung wurde mit 10 µl Dimethylformamid (DMF), das 2,9 mg SMCC enthielt, versetzt. Das Gemisch ließ man 1 Stunde bei 30°C reagieren. Das Reaktionsgemisch wurde auf eine mit 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,0 equilibrierte Sephadex G-25-Säule (1,0 x 45 cm) gegeben und ergab maleimidiertes OC. Getrennt davon wurden 10 mg KLH in 1 ml 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,0, mit 1 mM EDTA gelöst. Diese Lösung wurde mit 0,3 mg 2-Iminothiolan versetzt. Nach 30 Minuten Reaktion bei Raumtemperatur wurde das Reaktionsgemisch auf eine mit 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,0 und 0,1 M EDTA equilibrierte Sephadex G-25-Säule (1,0 x 45 cm) gegeben, um das Thiol-KLH zu erhalten. Die Lösung mit maleimidiertem OC und das Thiol-KLH wurden getrennt in Collodionschläuchen auf ungefähr 1 ml konzentriert und dann gemischt. Das Gemisch reagierte über Nacht bei 4°C. Danach wurde es auf eine mit 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,0, equilibrierte Ultrogel AcA44-Säule (1,5 x 48 cm) gegeben. Fraktionen von je 100 Tropfen wurden gesammelt. Verwendet wurden die Fraktionen 12 bis 14, die den Komplex von OC und KLH enthielten.

Die Lösung des OC-KLH-Komplexes wurde mit Freund's vollständigem Adjuvants im Verhältnis 1 : 1 (Vol/Vol) vermischt. Mit 50 µg dieser Mischung wurden Mäuse durch intraperitoneale Injektionen immunisiert. 14 Tage nach der ersten Immunisierung wurde die Lösung des OC-KLH-Komplexes mit Freund's unvollständigem Adjuvants im Verhältnis 1 : 1 (Vol/Vol) vermischt. Die Mäuse wurden wieder durch intraperitoneale Injektion von 50 µg des Gemisches immunisiert. Nach 14 Tagen wurde eine erneute letzte Immunisierung durch intraperitoneale Injektion von 50 µg des OC-KLH-Komplexes in jede Maus vorgenommen.

40

45

(3) Zellfusion und Clonierung

50

55

3 Tage nach der letzten Immunisierung wurde den immunisierten Mäusen die Milz entnommen, um Milzzellen zu erhalten. Die Zellen wurden mit Maus-Myelom P 3U 1-Zellen im Verhältnis 10 : 1 vermischt. Die Zellfusion wurde nach dem vorstehend erwähnten, in Nature publizierten Verfahren von Köhler und Milstein, durchgeführt. Die fusionierten Zellen wurden auf eine Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen übertragen und in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Gibco), das 1×10^{-4} M Hypoxanthin, 4×10^{-7} M Aminopterin, $1,6 \times 10^{-5}$ M Thymidin (HAT) und 10% fötale Kälberserum (FCS) enthielt, gezüchtet. Dieses Medium wurde HAT-Medium genannt. Nach einer Züchtung von 10 bis 17 Tagen wurde das Medium durch DMEM-Medium ersetzt, das 1×10^{-4} M Hypoxanthin und $1,6 \times 10^{-5}$ M Thymidin (HT) mit 10% FCS enthielt. Dieses Medium wurde HT-Medium genannt. Die Zellen wurden dann 5 bis 10 Tage in DMEM mit 10% FCS gezüchtet. Der Antikörpertiter im Kulturerstand der Vertiefungen, in denen Zellreplikation zu beobachten war, wurde durch ein Enzym-Antikörper-Verfahren analysiert. Hybridome, die Antikörper produzieren konnten, wurden durch das Grenz-Verdünnungs-Verfahren cloniert.

60

(4) Absuchen der Clone

65

Den Vertiefungen, in denen sich Clone und Hybridome vermehrt hatten, wurde der Kulturerstand entnommen. Nach dem ELISA-Verfahren (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) wurde nach solchen Hybridomen und Clonen gesucht, die Antikörper produzierten, die mit Rinder-OC mit einer Gla-Gruppe, nicht aber mit Rinder-OC ohne Gla-Gruppe reagierten. OC ohne Gla-Gruppe wurde nach der Methode von Poser et al., erhalten (Journal of Biochemistry, 254 (1979), 431), nach der Rinder-OC das unter Salzsäure-angesäuerten Bedingungen lyophilisiert wurde, bei 110°C hitzebehandelt wird.

Als nächstes wurde Rinder-OC mit einer Gla-Gruppe und Rinder-OC ohne Gla-Gruppe in getrennte Vertiefungen einer Mikrotiterplatte gebracht. 0,5 µg OC in einem Volumen von 50 µl wurden in jede Bohrung gegeben und die Rinder-OCs konnten bei 4°C in 18 Stunden adsorbieren. Danach wurden die Vertiefungen 3mal mit je 200 µl 10 mM Phosphat-gepufferter Salzlösung, pH 7,4, (PBS) gewaschen. 100 µl PBS mit 1% Rinderserumalbumin (BSA) wurde zu jeder Vertiefung gegeben. Die Mikrotiterplatte wurde 1 Stunde bei 37°C gehalten, um die nicht durch Antigen bedeckten Bereiche zu blockieren. Als nächstes wurden 50 µl von dem zu testenden Kulturüberstand in jede Vertiefung gegeben und die Reaktion wurde 1 Stunde bei 37°C durchgeführt. Die Vertiefungen wurden 3mal mit PBS gewaschen und zu jeder Vertiefung wurden 50 µl Peroxidase markiertes (Cappel) gegen Maus-IgG-gerichtetes Antiserum gegeben. Die Reaktion wurde 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die Vertiefungen wurden erneut 3mal mit PBS gewaschen. Dann wurde ein 0,1 M Citronensäure-Natriumhydroxid-Puffer, pH 4,0, zu den Vertiefungen gegeben, der 0,01% Wasserstoffperoxid und 0,55 mg/ml 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS) (Boehringer-Mannheim) pro ml enthielt. Die Absorption bei 410 nm wurde bestimmt. Hybridome und Clone, die den gewünschten Antikörper produzierten, konnten dadurch identifiziert werden, daß sich die Proben mit Rinder-OC mit einer Gla-Gruppe färben, die mit Rinder-OC ohne Gla-Gruppe aber nicht färben. Mit diesem Verfahren wurde ein für Rinder-OC mit Gla-Gruppe spezifischer Clon erhalten.

Der Clon wurde OC4-30 genannt und wurde unter der Bezeichnung FERM BP-2725 beim Fermentation Research Institute of the Agency of Industrial Science and Technology hinterlegt. Ein anderer Clon, der sowohl mit OC mit Gla-Gruppe als auch mit OC ohne Gla-Gruppe reagierte, wurde ebenfalls erhalten. Dieser Clon wurde OC-G4 genannt und unter der Bezeichnung FERM BP-2724 hinterlegt.

(5) Herstellung der monoklonalen Antikörper

0,5 ml Pristan (Aldrich) wurde 7 Wochen alten BALB/c-Mäusen intraperitoneal injiziert. Frühestens 1 Woche später wurden den Mäusen 1–9 × 10⁸ Zellen des gezüchteten Clones intraperitoneal implantiert. 10 bis 14 Tage später wurde den Mäusen Ascites entnommen. Diese Probe wurde 10 Minuten bei 1200 × g zentrifugiert. Aus jeder Maus erhielt man 5–15 ml monoklonalen Antikörper enthaltenden Ascites.

(6) Reinigung des monoklonalen Antikörpers

Die unter (5) erhaltenen Ascites-Suspensionen wurden 2fach mit 50 mMol Phosphatpuffer, pH 7,3, verdünnt und mit einem gleichen Volumen von gesättigtem Ammoniumsulfat vermischt. Das Präzipitat wurde in einem möglichst kleinen Volumen Phosphatpuffer gelöst und gegen denselben Puffer dialysiert. Die Probe wurde auf eine DEAE-Cellulosesäule gegeben. Aus dem Clon OC 4-30 erhielt man so den monoklonalen Antikörper OC 4-30, der für OC mit Gla-Gruppe spezifisch ist. In analoger Weise erhielt man aus dem Clon OC-G4 den monoklonalen Antikörper OC-G4.

(7) Physiochemische Eigenschaften des monoklonalen Antikörpers

Mit der Methode nach Ouchterlony wurde die Immunglobulinunterklasse des monoklonalen Antikörpers OC 4-30 als IgG_{2a} bestimmt. Das Molekulargewicht des Antikörpers beträgt nach SDS-Polyacrylamidgelektrophorese 145 000. Die Immunglobulinunterklasse des monoklonalen Antikörpers OC-G4 ist IgG₁ und dessen Molekulargewicht beträgt 145 000.

Die durch ELISA ermittelten Reaktivitäten der monoklonalen Antikörper mit Rinder-OC, das eine Gla-Gruppe enthält bzw. mit Rinder-OC, das keine Gla-Gruppe enthält, sind in Tabelle I gezeigt. Der monoklonale Antikörper OC4-30 reagiert spezifisch mit Rinder-OC, das eine Gla-Gruppe hat.

Tabelle I

50	Monoklonaler Antikörper	Antikörper, der an der Mikrotiterplatte fixiert ist	
		Rinder-OC mit Gla-Gruppe	Rinder-OC ohne Gla-Gruppe
55	OC-G4	0,738*)	0,754
	OC4-30	0,816	0,052

*) OD 405 nm

Beispiel 2

Bestimmung von OC mit Gla-Gruppe nach dem Sandwich-EIA-Verfahren unter Verwendung von monoklonalem Antikörper: Die monoklonalen Antikörper OC4-30 und OC-G4 wurden als Reagenzien zur Bestimmung von OC mit Gla-Gruppe verwendet.

(1) Markierung des monoklonalen Antikörpers mit Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase = HRP)

4 mg HRP wurden in 1 ml destilliertem Wasser gelöst und mit 0,2 ml 0,1 M Natriumperjodat versetzt. Das Gemisch reagierte 20 Minuten bei Raumtemperatur und wurde dann mit 0,02 ml eines 1 mM Natriumacetatpuf-

fers, pH 9,5, versetzt, um den pH auf 9 bis 9,5 zu bringen. Gleichzeitig wurden auch 8 mg/ml des monoklonalen Antikörpers OC-G4, der gegen 0,01 M Natriumcarbonatpuffer, pH 9,5, dialysiert worden war, hinzugegeben. Nach 2 Stunden Reaktion bei Raumtemperatur wurde das Gemisch mit 0,1 ml 4 mg/ml Natriumborhydrid versetzt und 2 Stunden bei 4°C inkubiert. Das Reaktionsgemisch wurde einer Gelfiltration an einer Sephadex G-200-Säule unterworfen und der mit HRP markierte monoklonale Antikörper OC-G4 in einem 0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,5, der 0,1 M Natriumchlorid enthielt, eluiert.

5

(2) Bestimmung von OC nach dem Sandwich-EIA-Verfahren

100 µl einer Lösung des monoklonalen Antikörpers OC4-30 in PBS mit einer Konzentration von 20 µg/ml wurden in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben. Die Platte wurde über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Lösung in den Vertiefungen wurde verworfen und 100 µl PBS mit 1% BSA wurden in jede Vertiefung gegeben. Zum Blockieren wurde 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die Vertiefungen wurden sorgfältig mit PBS gewaschen und 50 µl der Probenlösung wurden hinzugegeben. Die Probenlösung wurden mit 50 µl einer Lösung des monoklonalen mit HRP-markierten Antikörpers OC-G4, der in PBS, das 1% BSA enthielt, verdünnt worden war, versetzt. Die Platte wurde 18 Stunden bei 4°C inkubiert. Die Vertiefungen wurden 3mal mit PBS gewaschen. Dann wurden 0,1 ml eines 0,1 M Citratpuffers, pH 4,5, der 0,01% Wasserstoffperoxid und 1 mg/ml o-Phenyldiamin enthielt, dazugegeben. Bei Raumtemperatur wurde 20 Minuten inkubiert. Dann wurde mit 0,1 ml einer 1 N Schwefelsäure versetzt und die Absorption bei 492 nm gemessen.

10

15

20

(3) Sensitivität und Spezifität des Analysesystems

Die Sensitivität und die Spezifität des Analysesystems wurden unter Verwendung der Standard-OC-Lösungen (0,5 bis 55 ng/ml) des Osteocalcin-RIA-Kits von Compagnie Oris Industrie S.A., von menschlichem Standardserum und von OC, das kein Gla enthielt, bestimmt.

25

Die Ergebnisse sind in Fig. 1 gezeigt. Das Diagramm zeigt die Sensitivität und Spezifität der Analyse von OC beim Sandwich-EIA-Verfahren, wenn der erfindungsgemäße monoklonale Antikörper verwendet wird. Die X-Achse gibt die OC-Konzentrationen in ng/ml an und die y-Achse gibt die Absorption bei einer Wellenlänge von 492 nm an. Wie aus der Abbildung zu ersehen ist, ließ sich OC mit einer Gla-Gruppe (gefüllte Kreise) mit dem Sandwich-EIA-Verfahren noch in einer Konzentration von 0,5 ng/ml nachweisen, wobei die Konzentration von OC im Standardserum (offenen Dreiecke) 6,0 ng/ml betrug. OC ohne Gla-Gruppe (offene Kreise) führte zu keiner Farbentwicklung bei Konzentrationen bis zu 1000 ng/ml. Damit war gezeigt, daß der erfindungsgemäße monoklonale Antikörper als Teil eines Analysesystems verwendet werden kann, mit dem OC mit einer Gla-Gruppe spezifisch bestimmt werden kann.

30

35

40

Patentansprüche

- Monoklonaler anti-Osteocalcin-Antikörper, dadurch gekennzeichnet, daß er spezifisch mit Osteocalcin, das eine γ -Carboxyglutamatgruppe besitzt, reagiert und mit Osteocalcin, das keine γ -Carboxyglutamatgruppe enthält, nicht reagiert.
- Monoklonaler Antikörper gemäß Anspruch 1, der die folgenden Eigenschaften aufweist:
 - Molekulargewicht: 145 000
 - Immunoglobulin-Unterklasse: IgG_{2a}
 - Reaktivität: Reagiert mindestens mit Rinderosteocalcin, das eine γ -Carboxyglutamatgruppe hat, und reagiert nicht mit Rinderosteocalcin das keine γ -Carboxyglutamatgruppe besitzt.
- Monoklonaler Antikörper gemäß einem der Ansprüche 1 bis 2, dadurch gekennzeichnet, daß er von dem unter der FERM-Nr. BP-2725 hinterlegten Hybridom produziert wird.
- Diagnostisches Besteck zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von einer γ -Carboxyglutamatgruppe enthaltendem Osteocalcin in Proben, dadurch gekennzeichnet, daß es einen monoklonalen Antikörper gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3 enthält.
- Diagnostisches Besteck gemäß Anspruch 4, wobei die Proben aus menschlichen oder tierischen Körpern stammen.
- Diagnostisches Besteck gemäß einem der Ansprüche 4 oder 5, wobei eine γ -Carboxyglutamatgruppe enthaltendes Osteocalcin spezifisch in Gegenwart von keine γ -Carboxyglutamatgruppe enthaltendem Osteocalcin bestimmt werden kann.
- Verfahren zur Analyse von Osteocalcin, bei dem die Menge von Osteocalcin in einer dem menschlichen oder tierischen Körper entnommenen Probe *in vitro* bestimmt wird, dadurch gekennzeichnet, daß ein monoklonaler Antikörper gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3 verwendet wird.
- Hybridom, dadurch gekennzeichnet, daß es einen monoklonalen Antikörper gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3 produziert.
- Hybridom gemäß Anspruch 8, das unter der FERM-Nr. BP-2725 hinterlegt ist.
- Hybridom, das unter der FERM-Nr. BP-2724 hinterlegt ist.
- Monoklonaler Antikörper, dadurch gekennzeichnet, daß er von dem Hybridom gemäß Anspruch 10 produziert wird.

45

50

55

60

65

Fig. 1

